

# Hémolymphe de glossines : récolte et analyse

par J. P. PETIT

Laboratoire de Biochimie de l'I. E. M. V. T.

## RÉSUMÉ

En vue de cultiver des souches de trypanosomes pathogènes sur cellules de glossines, l'étude d'un milieu pour cultures cellulaires de composition voisine de l'hémolymphe est entreprise.

Les analyses nécessaires à la détermination exacte des normes biochimiques et des composants de l'hémolymphe nécessitant des quantités relativement élevées d'échantillons, les divers protocoles de récolte sont étudiés et critiqués en fonction de l'exploitation finale des résultats.

Les prélèvements sont faits dans les élevages de *G. austeni*, *G. tachinoides* et *G. morsitans morsitans*.

Les analyses ont porté sur le pH, la pression osmotique des éléments chimiques classiques et les acides aminés libres.

Le pH de l'hémolymphe se situe autour de 6,8 et coïncide de façon remarquable avec celui des milieux de cultures cellulaires déjà essayés par d'autres auteurs.

Les résultats obtenus autorisent la poursuite des essais.

## INTRODUCTION

— La culture des trypanosomes pathogènes a déjà fait l'objet de très nombreuses recherches et la multiplicité des travaux publiés à ce sujet, si elle prouve l'importance qu'on y attache, montre également qu'aucune des solutions proposées jusqu'à maintenant ne s'est avérée satisfaisante. On peut résumer la situation en disant que des succès ont été obtenus puisque les parasites ont été maintenus en survie et même parfois se sont multipliés, mais il a encore été impossible de cultiver systématiquement des trypanosomes avec conservation de leurs propriétés originelles pathogènes. Dans un rapport, ITARD (J.) (7) écrit qu'un milieu de culture ne devait être, en principe, composé qu'après une analyse poussée de l'hémolymphe de l'insecte considéré.

C'est pourquoi le problème a été abordé sous un angle différent en partant du fait que l'Ins-

titut dispose d'un élevage de glossines en pleine expansion, ce qui représente un matériel de base pour les analyses.

— L'idée générale n'est pas nouvelle puisque TRAGER (W.) (10) s'en inspirait déjà en 1959 dans une étude extrêmement poussée ; elle a été reprise depuis par NICOLI (J.) et VATIER (9) qui ne pouvaient que constater le bilan négatif de ces essais et essayer de l'expliquer. On doit chercher à connaître la composition chimique de l'hémolymphe pour reconstituer artificiellement ce milieu et y cultiver des cellules de glossines. On peut penser qu'ensuite il sera possible d'y entretenir des souches de trypanosomes pathogènes pour les animaux, ou pour l'homme.

— Ce premier travail vise à étudier le mode de prélèvement de l'hémolymphe et à donner les résultats des premières analyses effectuées sur les échantillons ainsi récoltés. Il ne s'agit pas de

faire l'historique des cultures de cellules d'invertébrés pour lesquelles un des chercheurs les plus avancés actuellement est le Docteur VAGO, encore moins celui des cultures de trypanosomes.

## I. — MODES DE PRÉLÈVEMENT

Selon le but que l'on se propose d'atteindre on peut retenir 4 méthodes principales qui peuvent se classer en deux grands groupes :

1° La méthode intégrale qui s'adresse à des populations : glossines totales ou pupes broyées, portions de glossines broyées.

2° La méthode sélective qui s'adresse à des individus : méthode du piston liquide, méthode par exsudation.

### 1° Méthode intégrale.

#### a) extraits totaux.

— On broie ensemble une quantité importante d'insectes ou de pupes pour en extraire ensuite un liquide brut par centrifugation. Quand on voudra procéder à des analyses, on réunira plusieurs extraits pour obtenir la quantité d'échantillons nécessaire. En général on constitue des lots sur environ 2 ml, ce qui correspond à un nombre de 450 à 800 individus selon les espèces de glossines. Les résultats obtenus constitueront une bonne approximation du taux moyen de tel ou tel élément chez une glossine. Cette méthode permet de récolter les extraits au fur et à mesure de la production de l'élevage et, en s'adressant à des mouches d'âge déterminé, de rapporter les résultats à un stade donné du cycle biologique.

— Pour des raisons de commodité de manipulation nous avons utilisé principalement dans ce travail des pupes prêtes à éclore, considérant comme hypothèse d'approche que leur composition serait assez voisine de celle de mouches venant de sortir des pupes. La récolte est ainsi rapide et permet d'aboutir relativement vite à des quantités d'extrait analysables. Ce procédé n'a pas que des avantages, en particulier certaines réserves s'imposent quant aux différences qui peuvent exister entre l'hémolymph circulant de l'insecte et l'extrait brut total obtenu par centrifugation après broyage. Un autre

inconvenient réside dans le fait qu'on étudie en un mélange indistinct les deux sexes, mais on peut y pallier en utilisant des mouches fraîchement écloses.

#### b) extraits partiels.

— Le procédé est voisin du précédent, mais il s'adresse uniquement aux mouches et le broyage n'est fait qu'après les avoir séparées en leurs diverses parties : tête, thorax, pattes, abdomen, etc... Les renseignements obtenus après dosages, se rapporteront ainsi aux éléments disséqués avant l'obtention de l'extrait liquide brut. La finesse de l'analyse est ici en rapport direct avec la finesse de la dissection.

### 2° Méthode sélective.

#### a) méthode du piston liquide.

— Extrêmement séduisant, le procédé consiste à réaliser deux perforations dans la chitine de l'insecte, l'une sous l'abdomen, l'autre sur le côté du thorax, puis à injecter du liquide de Ringer au 1/10 par le thorax ; on récolte la goutte de liquide qui perle au niveau de l'abdomen. On utilise une ultramicro-seringue capable de mesurer le demi-microlitre et des aiguilles capillaires.

— L'hypothèse de base est que le liquide injecté refoule dans l'insecte l'hémolymph circulant sans s'y mélanger, sauf dans la zone de contact, qui n'est pas récoltée : on ne recueille que la première goutte qui perle après avoir injecté seulement de 1 à 2 microlitres dans le thorax ; WYATT ( S. S. ) (11) a déjà récolté ainsi l'hémolymph du ver à soie et GRACE ( T. D. C. ) celle de *Callosamia* (5) et du même ver à soie (6) ; ces auteurs ont travaillé chez la larve et ont été gênés par la grande quantité de lipides présents.

— Le principal avantage de ce mode de récolte est l'obtention d'hémolymph particulièrement pure et le fait que la même mouche peut servir à plusieurs prélèvements successifs. Mais sa pratique est longue et délicate et si le résultat des analyses sur cette hémolymph est sans critique du point de vue qualitatif on verra qu'il n'en est pas de même au point de vue quantitatif, une erreur due à la dilution étant probable.

### b) méthode de l'exsudation.

— Extrêmement utilisée en particulier par KNIGHT (R. H.) (8) et BURSELL (A.) (1) pour l'analyse des acides aminés libres ; il suffit de sectionner une des pattes postérieures près du corps et de récolter l'hémolymph qui exsude dans un tube capillaire appliqué sur la section. En serrant convenablement l'insecte on peut recueillir jusqu'à 2 microlitres de liquide mais parfois on ne récolte rien du tout et sur les mouches d'élevage, il a jusqu'ici été impossible de récolter plus de 0,25 microlitres par ce procédé dans nos laboratoires.

— Sur les plans théorique et pratique l'hémolymph ainsi obtenue est bien le liquide intérieur à l'organisme de l'insecte et les analyses effectuées peuvent être quantitatives, mais la lenteur de la récolte et le peu de liquide collecté ne permettent pas d'obtenir rapidement tous les résultats souhaités. De plus, elle ne peut pas être pratiquée sur les pupes. Pour l'étude chromatographique de l'hémolymph ce procédé reste le meilleur car les analyses peuvent alors être pratiquées sur une seule glossine même avec les faibles quantités que nous avons pu recueillir ainsi.

— Pour ce travail les deux modes de prélèvement ont été utilisés, intégral et sélectif, le premier sur les pupes et le second au moyen du piston liquide sur les adultes, ceci en raison du but poursuivi qui était l'analyse rapide d'échantillons suffisamment abondants (broyage) et le contrôle qualitatif de ces analyses par comparaison avec l'hémolymph récoltée même diluée, par la méthode sélective (piston liquide).

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1° Les glossines.

L'élevage du Service d'Entomologie de l'I. E. M. V. T. produit régulièrement *Glossina austeni*, *Glossina tachinoides* et *Glossina morsitans morsitans* cette dernière d'origine Rhodésienne. Des pupes de ces trois espèces sont broyées au 24<sup>e</sup> jour de pupaison.

Les mouches sont réparties en jeunes mâles et jeunes femelles, non nourris, à l'éclosion, et vieux mâles à jeun depuis 12 h, ayant servi à la reproduction.

### 2° Mode d'obtention des prélèvements.

#### a) extrait brut des pupes.

On centrifuge à 25.000 g pendant 55 mn des pupes écrasées avec un agitateur sur un disque en verre fritté n° 00 soudé dans la lumière d'un tube qui est introduit dans les godets en plastique de la centrifugeuse. Après pipetage du liquide qui a filtré, on centrifuge à nouveau à la même vitesse mais pendant 15 mn seulement et après avoir remalaxé le broyat. On obtient ainsi trois couches superposées nettement distinctes. En surface quelques lipides accompagnés d'une fine pellicule pigmentaire, l'extrait brut liquide et au fond un culot très pigmenté en rouge brun. Ces trois couches sont récoltées séparément en commençant par celle du milieu après avoir incliné le tube pour que les couches extrêmes ne se mélangent pas. On obtient ainsi en moyenne 3,7 microlitres pour *Gl. morsitans*, 3,5 pour *Gl. austeni* et 3,6 pour *Gl. tachinoides*. Après la récolte tous les prélèvements sont congelés à  $-30^{\circ}\text{C}$  sans délais. On diminue ainsi les risques de mélanisation, qui sont importants.

Dès la décongélation pour dosage on ajoute 1 microlitre/ml d'acide ascorbique en solution aqueuse à 1 mg/ml, sauf pour les mesures de pH.

#### b) hémolymph de mouches.

Une certaine quantité d'hémolymph a été recueillie par la méthode du piston liquide sur des mâles et des femelles adultes ; en général il faut injecter au moins 2 microlitres de Ringer au 1/10 pour obtenir un peu d'hémolymph.

### 3° Méthodes d'analyse.

Les méthodes d'analyses sont toutes celles dont les protocoles ne demandaient que de faibles quantités d'échantillon et pour les autres qui ne se trouvaient pas classiquement dans la littérature une miniaturisation a été effectuée au laboratoire. Les protocoles de dosages ainsi mis au point feront l'objet de publications séparées. Pour mesurer le pH, un potentiomètre Methrohm E 353 a été utilisé et les lectures spectrophotométriques ont été faites avec un spectrophotomètre PMQ II associé à un enregistreur Sefram GR VAMK.

Il a fallu environ 5.000 mouches de chacune des 3 espèces pour réaliser ce travail. On peut déjà en conclure que les résultats représentent

une bonne approximation des moyennes rencontrées parmi les populations utilisées.

### III. — RÉSULTATS

— Les principales données physiques qui

permettent de reconstituer un milieu de culture ainsi que le dosage des éléments qu'il semble le plus important de connaître sont regroupés dans le tableau n° 1. Toutes les données qu'il contient sont relatives aux pupes prélevées au 24<sup>e</sup> jour.

TABLEAU N° I

Analyses d'extract brut de pupes de glossines prélevées au 24<sup>e</sup> jour.

	<i>G. morsitans</i>	<i>G. austeni</i>	<i>G. tachinoides</i>
Nombre de pupes	911	1 325	1 255
pH	6,65	6,62	6,62
Azote total en mg/ml	7,08	6,34	13,0
Pression osmotique en osmoles	0,575	0,588	0,604
Phosphore minéral labile en mg p. 1 000	99,6	96	99,6
Phosphore total acidosoluble en mg p. 1 000	1 220	552	1 880
Na <sup>+</sup> mg/ml	1,7	1,9	2,0
K <sup>+</sup> mg/ml	1,6	2,4	2,2
Na/K	1,06	0,79	0,91

— Des analyses ont pu être pratiquées sur l'hémolymphé récoltée par la méthode du piston liquide sur un mélange de mâles et de femelles de *Gl. morsitans*, elles figurent dans le tableau n° 2.

TABLEAU N° II

Analyse de l'hémolymphé de *G. morsitans* adultes recueillie par la méthode du piston liquide

	Hémolymphé de <i>G. morsitans</i>
Azote total en mg/ml	5
Pression osmotique en atmosphères	8,0
Phosphore minéral mg p. 1000	30
Phosphore acidosoluble total mg p. 1000	66
Na <sup>+</sup> en mg/ml	0,16
K <sup>+</sup> en mg/ml	0,25
Na/K	0,64

— Par la méthode électrochromatographique on a pu confirmer la présence d'acides aminés libres dans l'hémolymphé recueillie à la patte postérieure. Les plus abondants étant par ordre décroissant : la proline, l'alanine puis la sérine, la lysine et l'histidine. Les migrations ont été effectuées sur couche mince de poudre de cellulose MN 300 sans liant. L'électrophorèse a été faite avec le tampon formacétique de pH 1,25 sous 400 V et la chromatographie en solvant butanol acide acétique eau (3 : 1 : 5). L'hémolymphé était déposée directement sur la couche mince dès après le prélèvement. Avec 0,25 micro-litres on peut effectuer une analyse.

### IV. — DISCUSSION

#### 1<sup>o</sup> Mesure du pH.

Le mode de prélèvement semble peu influencer sur le pH, mais lors du prélèvement à la seringue de légères différences concernant mâles et femelles ont pu être mises en évidence (tableau n° 3). Ces résultats montrent l'uniformité

TABLEAU N° III

pH de l'hémolymph de *G. morsitans* récoltée, soit à la seringue, soit par centrifugation.

<i>G. morsitans</i>	Hémolymph à la seringue	Hémolymph par centrifugation
Jeunes femelles	7,50	6,70 (âgées d'1 jour)
Jeunes mâles	6,48	6,70 (âgées d'1 jour)
Vieux mâles	6,70	
Pupes 24 j.		6,65

misation réalisée au sein de l'extrait brut obtenu par centrifugation que ce soit des pupes ou des mouches, le broyage des tissus libérant sans aucun doute des substances étrangères à l'hémolymph. Les valeurs les plus intéressantes du pH sont donc celles relevées sur l'hémolymph recueillie à la seringue ; elles révèlent des différences intéressantes entre les sexes. Une légère variation du pH au cours de la vie des mâles peut ne correspondre qu'au mode d'alimentation sur lapin ou à une évolution du métabolisme.

— Les meilleurs cultures de TRAGER (10) et de NICOLLI (9) respectivement D<sub>4</sub> et D<sub>2</sub> avaient un pH très voisin de celui de l'hémolymph : 6,7 à 6,9 et 6,8. Les essais de culture d'ITARD (7) ont été réalisés avec un milieu de pH 6,9 ce qui semble excellent.

## 2° Analyses.

Les analyses chimiques résumées dans les tableaux 1 et 2 montrent bien que l'hémolymph recueillie à la seringue est plus diluée que l'extrait brut obtenu par centrifugation. Ce seront donc les résultats réunis dans le tableau 1 qui serviront de première base à l'élaboration d'un milieu de culture. Il n'est malheureusement pas possible de les comparer aux milieux de culture déjà essayés car il entre dans leur composition de nombreux éléments non synthétiques et les analyses correspondantes sur le milieu total n'ont pas été effectuées sauf pour le milieu essayé par ITARD au laboratoire du Docteur VAGO, qui donne en particulier un rapport Na/K, de 23, ce qui semble un peu élevé si on le compare à ceux obtenus (tableau 1).

## 3° Acides aminés libres.

Les acides aminés libres de l'hémolymph de vieille mouche trouvés en quantité la plus importante sont bien les mêmes que ceux indiqués par BURSELL (E.) et confirmés par KNIGHT (R. H.) : la proline et l'alanine, en quantité moindre la serine, la lysine n'est trouvée par KNIGHT que dans l'abdomen, tandis que BURSELL en trouve aussi dans l'hémolymph et que les expériences citées plus haut nous indiquent également son existence ; enfin d'histidine non trouvée par ces deux auteurs et que nous avons rencontrée en faible quantité.

L'étude de ces acides aminés libres demande à être approfondie davantage pour vérifier l'influence du mode d'alimentation et de l'âge des mouches sur eux et rechercher les acides aminés qui seraient en plus faible quantité. L'intérêt de ces composés a été particulièrement démontré par BURSELL qui en a étudié le métabolisme et qui a démontré l'utilisation de la proline comme source d'énergie pour les muscles du vol. Ces particularités liées à des systèmes enzymatiques spéciaux, suffiraient à elles seules à faire engager de nouvelles recherches sur les glossines.

## V. — CONCLUSIONS

Pour essayer d'améliorer le milieu synthétique composé à partir de ces données, sans attendre le résultat des cultures cellulaires, il convient de poursuivre en analysant des éléments dont l'équilibre semble important pour le métabolisme des insectes, tels que Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup>. Il importe, particulièrement si les milieux comportent des éléments biologiques non contrôlables, d'effectuer sur eux les mêmes analyses que sur l'hémolymph afin d'instaurer un contrôle réel des milieux.

L'étude des protéines de l'hémolymph apportera aussi des connaissances importantes à la fois pour le milieu de culture et pour la lutte contre ces hôtes intermédiaires des trypanosomes. Toutes ces recherches sont en cours et s'enchaîneront logiquement à ce travail préliminaire.

Nous remercions particulièrement M. ITARD, Chef du Service d'Entomologie pour l'abondance et la régularité de la production en glossines qu'il a bien voulu mettre à notre disposition.

## SUMMARY

## Hemolymphs of tsetseflies : sampling and analysis

In order to cultivate strains of pathogenic trypanosoma on tsetseflies cells, the study of a cellular medium similar to the hemolymph's composition is undertaken.

Relatively large quantities of samples are necessary for exact evaluations of biochemical norms and hemolymph constituents and the different proceedings of collecting are then studied in order to final result exploitation.

The samplings result from breedings of *G. austeni*, *G. tachinoïdes* and *G. morsitans morsitans*.

The analysis have carried out pH, osmotic pressure, classic chemical elements and free amino acid.

The pH of hemolymph is about to 6,8 and is exactly similar to this of cellula culture mediums even traying by other authors.

The results then obtained allow previous trials with synthetic culture medium.

## RESUMEN

## Hemolinfas de glosinas : recogida y analisis

Para cultivar cepas de tripanosomas patogenos sobre células de glosinas, se estudia un medio para cultivos celulares cuya composición es semejante a la de la hemolinfa.

Necesitan cantidades relativamente elevadas de muestras las analisis para la determinación exacta de las normas bioquimicas y de los constituyentes de la hemolinfa. Se notan y se critican las varios procedimientos de recogida según la explotación final de los resultados.

Se toman las muestras en las crias de *G. austeni*, *G. tachinoïdes* y *G. morsitans morsitans*.

Se analizaron el pH, la presión osmotica de los elementos quimicos clasicos y los ácidos aminados libres

El pH de la hemolinfa es de 6,8 poco más o menos y coincide exactamente con el de los medios de cultivos celulares ya experimentados por otros autores.

Los resultados obtenidos permiten empezar ensayos con un medio de cultivo sintético.

## BIBLIOGRAPHIE ALPHABÉTIQUE

1. BURSELL (E.). — Free amino acids of the tse tse fly (*Glossina*). *Nature G. B.*, 27 août 1960, 187 (4739) : 778.
2. BURSELL (E.). — Aspects of the metabolism of amino acids in the tse tse fly *glossina* (Diptera). *J. insect. physiol.*, 1963, 9 : 439-52.
3. BURSELL (E.). — Oxaloacéticcarboxylase in flight musculature of the tse tse fly. *Comp. Biochem. physiol.*, 1965, 16 : 259-66.
4. GEIGY (R.), HUBER (M.), WEINMAN (D.) et WYATT (G. R.). — Demonstration of trehalose in the vector of African trypanosomiasis : the tse tse fly. *Acta Trop.*, 1959, 16 (3) : 255-62.
5. GRACE (T. D. C.). — The prolonged growth and survival of ovarian tissues of the promethea moth (*Callosamia promethea*) in vitro. *J. Gen. Physiol.*, 1958, 41 : 1027.
6. GRACE (T. D. C.). — Effects of various substances on growth of silkworm tissues in vitro. *Aust. J. biol. Scien.*, 1958, 11 : 407.
7. ITARD (J.). — Rapport annuel du laboratoire d'Entomologie de la portion centrale de l'I. E. M. V. T., 1967.
8. KNIGHT (R. H.). — Free amino-acids in the haemolymph of *Glossina* species. E.A.T.R.O. Report Journ. Déc. 1960, publié en 1961, p. 22-23.
9. NICOLI (J.) et VATTIER (G.). — Culture de *Trypanosoma rhodesense* sur tissus de pupes de glossines. *Bull. Soc. path. exot.*, 1964, 57 (2) : 213-19.
10. TRAGER (W.). — Tse tse fly tissue culture and the development of trypanosomes to the infective stage. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1959, 53 : 473-91.
11. WYATT (S. S.). — Culture in vitro of tissue from the silkworm *Bombyx mori* L. *J. Gen. Physiol.*, 1956, 39 : 841.